

10/0692905

REC'D 04 SEP 20

22.08.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP 00/05617

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 8月23日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第236007号

出 願 人

Applicant (s):

中外製薬株式会社

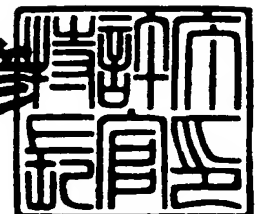
4

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月29日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3052475

【書類名】 特許願

【整理番号】 993953

【提出日】 平成11年 8月23日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 A61K 38/18
A61K 39/00

【発明の名称】 インターフェロンを有効成分とする HM 1 . 2 4 抗原の
発現増強剤

【請求項の数】 8

【発明者】

 【住所又は居所】 徳島県徳島市八万町千鳥 1 1 - 1 0

 【氏名】 小阪 昌明

【発明者】

 【住所又は居所】 徳島県徳島市南庄町 3 丁目 8

 【氏名】 尾崎 修治

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会
社内

 【氏名】 若原 裕二

【特許出願人】

 【識別番号】 000003311

 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100077517

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 石田 敬

 【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】

 【識別番号】 100092624

【弁理士】

【氏名又は名称】 鶴田 準一

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【選任した代理人】

【識別番号】 100081330

【弁理士】

【氏名又は名称】 樋口 外治

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9814920

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 インターフェロンを有効成分とする HM 1 . 2 4 抗原の発現増強剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 インターフェロン α または インターフェロン γ を有効成分とする、配列番号：2 に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質（HM 1 . 2 4 抗原）の骨髓腫細胞における発現増強剤。

【請求項 2】 有効成分として、

(1) インターフェロン α または インターフェロン γ および

(2) 配列番号：2 に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞傷害活性を有する抗体、
を含んで成る骨髓腫の治療剤。

【請求項 3】 骨髓腫が多発性骨髓腫である請求項 2 に記載の治療剤。

【請求項 4】 抗体がモノクローナル抗体である請求項 2 または 3 に記載の治療剤。

【請求項 5】 抗体が細胞傷害活性を有する抗体である請求項 4 に記載の治療剤。

【請求項 6】 抗体がキメラまたはヒト型化抗体である請求項 1 に記載の治療剤。

【請求項 7】 抗体が抗 HM 1 . 2 4 抗体である請求項 5 に記載の治療剤。

【請求項 8】 キメラまたはヒト型化抗体が、キメラ抗 HM 1 . 2 4 抗体またはヒト型化抗 HM 1 . 2 4 抗体である請求項 6 に記載の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、骨髓腫における HM 1 . 2 4 抗原の発現増強剤としてのインターフェロン α 及びインターフェロン γ の使用に関する。

【0 0 0 2】

【従来技術】

骨髄腫 (myeloma) は、形質細胞種 (plasmacytoma)、多発性骨髄腫 (multiple myeloma) とも呼ばれ、モノクローナルな形質細胞の骨髄内集積を特徴とする腫瘍性疾患である。骨髄腫は、免疫グロブリンを産生し分泌する終末分化B細胞、すなわち形質細胞がモノクローナルに主として骨髄において増加する疾患で、この疾患の患者の血清中にはモノクローナルな免疫グロブリンもしくはその構成成分であるL鎖、H鎖などが検出される。

骨髄腫の治療としては、これまで化学療法剤等が使用されているが、骨髄腫を完全寛解に導き、骨髄腫患者の生存期間を延長するような有効な治療剤は見いだされておらず、骨髄腫の治療効果を有する薬剤の登場が待たれていた。

【0003】

一方、Goto, T.らは、ヒト骨髄腫細胞をマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体 (マウス抗HM1. 24抗体) を報告している (Blood (1994) 84, 1922-1930)。ヒト骨髄腫細胞を移植したマウスに抗HM1. 24抗体を投与すると、この抗体が腫瘍組織に特異的に集積したこと (小阪昌明ら、日本臨床 (1995) 53, 627-635) から、抗HM1. 24抗体はラジオアイソトープ標識による腫瘍局在の診断や、ラジオイムノセラピーなどのミサイル療法に応用することが可能であることが示唆されている。

【0004】

また、上記Blood (1994) 84, 1922-1930には、抗HM1. 24抗体が、in vitroにおいて、ヒト骨髄腫細胞株RPMI 8226に対して細胞傷害活性を有することが述べられている。また、マウス抗HM1. 24抗体をキメラ化したキメラ抗HM1. 24抗体、およびヒト型化した再構成抗HM1. 24抗体が、骨髄腫細胞に特異的に結合すること、さらには細胞傷害活性を有することが示されている (Blood (1999) 93, 3922-3930)。

【0005】

このように、HM1. 24抗原は、終末分化B細胞である骨髄腫細胞に特異的に高発現しており、この抗原を認識する抗HM1. 24抗体は、細胞表面のHM1. 24分子数に比例して殺細胞活性を発揮することから、抗HM1. 24抗体を用いた免疫療法は多発性骨髄腫に有効な治療法と考えられる。従って、抗HM

1. 24 抗体の抗原である HM 1. 24 抗原の細胞表面上の発現量を増強することができれば、より少量の抗体投与により同等の細胞傷害活性が期待でき、副作用をより低下させることが可能となる。

【0006】

一方、ウイルス増殖抑制活性を示す物質として発見されたインターフェロンは、現在、ほ乳類においては、 α 、 β 、 γ 及び ω の 4 種類に分類され、多彩な生理活性を有することが知られている (Pestka, S., et.al., Ann.Rev.Biochem. (1987) 56, 727-777; Langer, J.A., et.al., Immunology Today (1988) 9, 393-400)。しかしながら、インターフェロン α およびインターフェロン γ が、骨髓腫細胞において、HM 1. 24 抗原の発現量を増加させる作用を有することについては報告がなかった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

現在行われている骨髓腫の治療は、上記のごとく、未だ完全ではなく、骨髓腫を完全寛解に導き、患者の生存期間を延長させる画期的な治療剤あるいは治療法が待たれている。抗 HM 1. 24 抗体による骨髓腫の治療は、特異性及び有効性の点で画期的な治療剤となる可能性があり、抗 HM 1. 24 抗体の作用をより効果的に発揮させる方法が望まれている。

従って、本発明の目的は、骨髓腫細胞において、HM 1. 24 抗原の発現量を増加させることで、抗 HM 1. 24 抗体の骨髓腫抑制作用を増強させる手段を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、かかる方法を提供すべく、HM 1. 24 抗原の発現量を増加させる薬剤を探索した結果、インターフェロン α およびインターフェロン γ が所望の活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

従って本発明は、インターフェロン α またはインターフェロン γ を有効成分とする、配列番号：2 に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質 (HM 1. 24 抗原) の骨髓腫細胞における発現の増強剤を提供する。

【0009】

本発明はまた、有効成分として、

(1) インターフェロン α またはインターフェロン γ 、及び

(2) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、且つ細胞傷害活性を有する抗体、
を含んで成る、骨髓腫の治療剤を提供する。

上記の骨髓腫として典型的なものは多発性骨髓腫である。

前記抗体は、好ましくはモノクローナル抗体、キメラ抗体又はヒト型化抗体であり、好ましくは細胞傷害活性を有するものである。

【0010】

【発明の実施の形態】

インターフェロン α 及びインターフェロン γ

本発明で使用するインターフェロン α 及びインターフェロン γ は、HM1.24抗原の発現量を増加させる活性を有する限り変異体を用いることも可能である。HM1.24抗原の発現量を測定するには、実施例に記載されたように、骨髓腫細胞株あるいは骨髓腫患者から採取した骨髓腫細胞を用いて、フローサイトメトリーにより検出することができる。変異体としては、例えば、1もしくは数個、あるいは複数個のアミノ酸残基が、欠失または置換または挿入または付加等により変異されたインターフェロン α 及びインターフェロン γ であってもよい。

【0011】

欠失または置換または挿入を蛋白に導入する方法としては、対応する遺伝子を改変する部位特異的変異誘発法を用いることができる (Hashimoto-Gotoh, Gene (1995) 152, 271-275, Zoller, Methods Enzymol. (1983) 100, 468-500, Kramer, Nucleic Acids Res. (1984) 12, 9441-8456, Kunkel, Proc.Natl.Acad.Sci. USA (1985) 82, 488-492, 「新細胞工学実験プロトコル 東京大学医科学研究所 制癌研究部編 (1993) p241-248」)。

【0012】

また、市販のPCRを利用した「部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL)」や「QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit」(ストラタジーン社製)を

利用することも可能である。また、蛋白質中のアミノ酸の変異は自然界においても生じることもある。また、この様に変異を導入された蛋白がもとの蛋白と同様の活性を有することは、Mark, Proc.Natl.Acad.Sci. USA (1984) 81, 5662-5666 に示されている。

【0013】

アミノ酸残基の置換においては、性質の保存されたアミノ酸どうしで置換することが好ましい。例えば、疎水性アミノ酸 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水性アミノ酸 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G, A, V, L, I, P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S, T, Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C, M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D, N, E, Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R, K, H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H, F, Y, W) どうしの置換が好ましい。

【0014】

さらに、変異体としては、インターフェロン α 又はインターフェロン γ のペプチド断片を用いることも可能である。特に、インターフェロン α 又はインターフェロン γ 受容体との結合部位を有するペプチド断片が好ましい。好ましくは100個以上、さらに好ましくは130個以上、さらに好ましくは150個、最も好ましくは160個以上の連続するアミノ酸残基から構成されるペプチド断片である。

【0015】

ハイブリドーマ

本発明で使用する抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、HM1.24抗原蛋白質やHM1.24抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0016】

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原であるHM1.24抗原発現細胞としては、ヒト多発性骨髄腫細胞株であるKPM2（特開平7-236475）やKPC-32（Goto, T. et al., Jpn.J.Clin.Hematol. (1991) 32, 1400）を用いることができる。また、感作抗原として配列番号1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質、あるいは抗HM1.24抗体が認識するエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドを使用することができる。

【0017】

なお、感作抗原として使用される、配列番号1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質のcDNAはpUC19ベクターのXbaI切断部位の間に挿入されて、プラスミドpRS38-pUC19として調製されている。このプラスミドpRS38-pUC19を含む大腸菌（E. coli）は、平成5年（1993年）10月5日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に、Escherichia coli DH5α（pRS38-pUC19）として、受託番号FERM BP-4434としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている（特開平7-196694参照）。このプラスミドpRS38-pUC19に含まれるcDNA断片を用いて遺伝子工学的手法により、抗HM1.24抗体が認識するエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドを作製することができる。

【0018】

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。

【0019】

具体的には、感作抗原をPBS（Phosphate-Buffered Saline）や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数

回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

【 0 0 2 0 】

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3 (J.Immunol. (1979) 123: 1548-1550), P 3 X 6 3 A g 8 U. 1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81: 1-7), N S - 1 (Kohler.G. and Milstein, C.Eur.J.Immunol. (1976) 6: 511-519), M P C - 1 1 (Margulies.D.H. et al., Cell (1976) 8: 405-415), S P 2 / 0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276: 269-270), F O (de St.Groth, S.F. et al., J.Immunol.Methods (1980) 35: 1-21), S 1 9 4 (Trowbridge, I.S.J.Exp.Med. (1978) 148: 313-323), R 2 1 0 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277: 131-133) 等が適宜使用される。

【 0 0 2 1 】

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler.G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール

(P E G)、センダイウィルス (H V J) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

【 0 0 2 2 】

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を 1 - 1 0 倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適な R P M I 1 6 4 0 培養液、M

EM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできる。

【0023】

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1000-6000程度のPEG溶液を通常、30-60%（w/v）の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞（ハイブリドーマ）が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

【0024】

当該ハイブリドーマは、通常の見分け培養液、例えば、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが行われる。

【0025】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroでHM1.24抗原またはHM1.24抗原発現細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、HM1.24抗原またはHM1.24抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるHM1.24抗原またはHM1.24抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号WO93/12227, WO92/03918, WO94/02602, WO94/25585, WO96/34096, WO96/33735参照）。

【0026】

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、

ば、グアニジン超遠心法 (Chirgwin, J.M.ら、Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、A G P C法 (Chmczynski, P.ら、(1987) 162, 156-159) 等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia製) 等を使用してmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia製) を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

【0030】

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit 等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech製) およびPCRを用いた5'-RACE法 (Frohman, M.A. ら、Proc.Natl.Acad.Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Be lyavsky, A. ら、Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) を使用することができる。得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシ法により確認する。

【0031】

目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域(C領域)をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでよい。

本発明で使用される抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

【0032】

改変抗体

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ (Chimeric) 抗体、ヒト型化 (

Humanized) 抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる(欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO96/02576参照)。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

【0033】

例えば、キメラ抗HM1.24抗体のL鎖およびH鎖を含むプラスミドを有する大腸菌は、各々Escherichia coli DH5 α (pUC19-1.24L-g κ) およびEscherichia coli DH5 α (pUC19-1.24H-g γ 1)として、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成8年8月29日に、各々FERM BP-5646およびFERM BP-5644としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている(特願平8-264756参照)。

【0034】

ヒト型化抗体は、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域(CDR; complementarity determining region)をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている(欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO96/02576参照)。

【0035】

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域(framework-region; FR)を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる(欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO96/02576参照)。

【0036】

C D Rを介して連結されるヒト抗体のF Rは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

例えば、ヒト型化抗HM 1. 24抗体のL鎖およびH鎖を含むプラスミドを有する大腸菌は、各々Escherichia coli DH5 α (pUC19-RVLa-AHM-gk) およびEscherichia coli DH5 α (pUC19-RVHr-AHM-g γ 1) として、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、平成8年8月29日に、各々FERM BP-5645およびFERM BP-5643としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている (特願平8-264756参照)。

【0037】

キメラ抗体、ヒト型化抗体には、ヒト抗体C領域が使用され、細胞傷害活性を呈するヒト抗体C領域として、ヒトC γ 例えば、C γ 1, C γ 2, C γ 3, C γ 4を使用することができる。これらのうち、特にC γ 1, C γ 3を有する抗体が強力な細胞傷害活性、すなわち、ADCC活性、CDC活性を有し、本発明に好適に使用される。

【0038】

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC領域からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域 (framework region; F R) およびC領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

本発明に使用されるヒト型化抗体の好ましい具体例としては、ヒト型化抗HM 1. 24抗体が挙げられる (特願平8-264756参照)。

【0039】

発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げるることができる。

【0040】

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV40) 等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1 α (HEF1 α) などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV40プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 α プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

【0041】

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げるることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

【0042】

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S.P. et al J.Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター/エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター/エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

【0040】

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター/エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV40) 等のウィルスプロモーター/エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1 α (HEF1 α) などの哺乳類細胞由来のプロモーター/エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV40プロモーター/エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 α プロモーター/エンハンサーを使用する場合、Mizushimaらの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

【0041】

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature

(1098) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

【0042】

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pepBシグナル配列 (Lei, S.P. et al J.Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構

造を適切にリフォールド (refold) して使用する (例えば、WO 96/30394 を参照)。

【0043】

複製起源としては、SV40、ポリオマウイルス、アデノウイルス、ウシバピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Eco gpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、in vitro および in vivo の産生系がある。in vitro の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

【0044】

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO, COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa, Vero、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは (3) 昆虫細胞、例えば、sf9, sf21, Tn5 などが知られている。植物細胞としては、ニコティアナ (Nicotiana) 属、例えばニコティアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) などが知られている。

【0045】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、枯草菌が知られている。

これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM, MEM, RPMI 1640, IMDMを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、*in vivo* にて抗体を産生してもよい。

【0046】

一方、*in vivo* の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシなどを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Application, 1993)。また、昆虫としては、カイコなどを用いることができる。

植物を使用する場合、タバコなどを用いることができる。

【0047】

これらの動物または植物に抗体遺伝子を導入し、動物または植物の体内で抗体を産生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含む DNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

【0048】

また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウィルスのカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えば pMON530 に挿入し、このベクターを

アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばニコチニア・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24, 131-138)。

【0049】

上述のように *in vitro* または *in vivo* の産生系にて抗体を産生する場合、抗体重鎖 (H鎖) または軽鎖 (L鎖) をコードする DNA を別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいは H鎖および L鎖をコードする DNA を単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい (国際特許出願公開番号 WO 94-11523 参照)。

【0050】

上述のように得られた抗体は、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合させ抗体修飾物として使用することもできる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

【0051】

抗体の分離、精製

前期のように産生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテイン A カラム、プロテイン G カラムが挙げられる。プロテイン A カラムに用いる担体として、例えば、Hyper D, POROS, Sepharose F.F. 等が挙げられる。

【0052】

その他、通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用する抗体を分離、精製することができる。クロマ

トグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。

【0053】

抗体の濃度測定

上記方法で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定またはELISA等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、本発明で使用される抗体又は抗体を含むサンプルをPBS（-）で適当に希釈した後、280nmの吸光度を測定し、1mg/mlを1.350Dとして算出する。また、ELISAによる場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M重炭酸緩衝液（pH9.6）で1μg/mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG（BIO SOURCE製）100μlを96穴プレート（Nunc製）に加え、4℃で一晩インキュベーションし、抗体を固層化する。

【0054】

ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用される抗体または抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG（CAPPEL製）100μlを添加し、室温にて1時間インキュベーションする。洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG（BIO SOURCE製）100μlを加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550（Bio-Rad 製）を用いて405nmでの吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

【0055】

FCM解析

骨髄腫細胞と本発明で使用される抗体との反応性は、FCM（フローサイトメトリー）解析で行うことができる。細胞としては、樹立細胞株あるいは新鮮分離細胞を用いることができる。樹立細胞株としては、骨髄腫由来RPMI 8226（ATCC CCL 155）、同U266（ATCC TIB 196）、同KPMM2、同KPC-32、形質細胞腫由来ARH-77（ATCC CRL 1621）などを用いることができる。

【0056】

上記細胞をPBS(-)で洗浄した後、FACS緩衝液(2%ウシ胎児血清、0.05%アジ化ナトリウム含有PBS(-))で $25\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈した抗体あるいはコントロール抗体 $100\mu\text{l}$ を加え、氷温化30分インキュベートする。FACS緩衝液で洗浄した後、 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ のFITC標識ヤギ抗マウス抗体(GAM, Becton Dickinson 製) $100\mu\text{l}$ を加え、氷温化30分間インキュベートする。FACS緩衝液で洗浄した後、 $600\mu\text{l}$ あるいは 1ml のFACS緩衝液に懸濁し、FACScan(Becton Dickinson製)で各細胞の蛍光強度を測定すればよい。

【0057】

細胞傷害活性

ADCC活性の測定

本発明に使用される抗体は、細胞傷害活性として、例えば、ADCC活性を有する抗体である。

本発明において骨髄腫細胞に対するADCC活性は、次のようにして測定することができる。まず、ヒトの末梢血や骨髄より比重遠心法で単核球を分離し、エフェクター細胞(Effector cell : E)として調製する。

【0058】

また、標的細胞(Target cell : T)としては、RPMI 8226(ATCC CCL 155), U266(ATCC TIB 196), KPMM2, KPC-32, ARH-77(ATCC CRL 1621)などを 51Cr により標識して、標的細胞として調製する。次いで、標識した標的細胞にADCC活性を測定する抗体を加えインキュベートし、その後、標的細胞に対し適切な比のエフェクター細胞を加えインキュベートする。

【0059】

インキュベートした後上清を取り、ガンマカウンターで放射活性を測定する。その際、最大遊離放射能測定用に、1%のNP-40を用いることができる。細胞傷害活性(%)は、 $(A-C)/(B-C) \times 100$ で計算することができる。なお、Aは抗体存在下において遊離された放射活性(cp μ)、BはNP-40により遊離された放射活性(cp μ)、Cは抗体を含まず培養液のみで遊離された

放射活性 (cpm) である。

【0060】

細胞傷害活性の増強

ADCC活性のような細胞傷害活性を発揮するには、ヒトにおいては抗体定常領域 (C領域) としてC γ 、特にC γ 1, C γ 3を使用することが好ましい。さらに、抗体C領域のアミノ酸を一部付加、改変、修飾することにより、より強力なADCC活性、あるいはCDC活性を誘導することができる。

【0061】

例えば、アミノ酸置換によるIgGのIgM様ポリマー化 (Smith, R.I.F. & Morrison, S.L. BIO/TECHNOLOGY (1994) 12, 683-688)、アミノ酸付加によるIgGのIgM様ポリマー化 (Smith, R.I.F. et al., J. Immunology (1995) 154, 2226-2236)、L鎖をコードする遺伝子の直列連結での発現 (Shuford, W. et al., Science (1991) 252, 724-727)、アミノ酸置換によるIgGの二量体化 (Caron, P.C. et al., J. Exp. Med. (1992) 176, 1191-1195, Shopes, B., J. Immunology (1992) 148, 2918-2922)、化学修飾によるIgGの二量体化 (Wolff, E. A. et al., Cancer Res. (1993) 53, 2560-2565)、および抗体ヒンジ領域のアミノ酸改変によるエフェクター機能の導入 (Norderhaug, L. et al., Eur. J. Immunol. (1991) 21, 2379-2384) が挙げられる。

【0062】

これらは、プライマーを利用したオリゴマー部位特異的変異導入法、制限酵素切断部位を利用した塩基配列の付加、共有結合をもたらす化学修飾剤を使用することによって達成される。

【0063】

【実施例】

実施例 1. インターフェロン α による骨髓腫細胞におけるHM1. 24抗原発現量の増強

ヒト骨髓腫細胞株U266 (ATCC TIB 196) および多発性骨髓腫患者の骨髓由来の骨髓腫細胞を10%ウシ胎児血清 (Whittaker Bioproducts, Inc, Walkersville, MD, USA) を含むRPMI 1640培地 (Sigma, St Louis,

MO, USA) を用い、5%炭酸ガス培養器中、37℃で培養した。マウス抗HM1.24抗体を生産するハイブリドーマは、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1-1-3）に寄託番号FERM BP-5233（寄託日1995年4月27日）として寄託されている。

【0064】

骨髓腫細胞（ 1×10^5 / ml）を1000 U/mlの天然型インターフェロナー α （大塚製薬、東京）存在下又は非存在下に48時間培養し、HM1.24抗原（それをコードする塩基配列を配列番号：1に示す）の変化をフローサイトメトリーで測定した。細胞を0.1%ウシ血清アルブミン（Sigma, St Louis, MO, USA）と0.02%アジ化ナトリウムを添加したリン酸緩衝液（Gibco BRL, Grand Island, NY, USA）で洗浄後、ヒト免疫グロブリン（3 mg/ml、ミドリ十字、大阪）を加えたPBS（100 μ l）に浮遊させ、4℃で15分間、反応させた。

【0065】

その後、2 μ lのFITC-ヒトIgG1（1 mg/ml）又はFITC-抗HM1.24抗体（1 mg/ml）を加え、4℃で60分間、染色した。患者骨髓腫細胞を用いた場合、骨髓腫細胞の同定には20 μ lのPE-anti-CD38（Becton Dickinson, San Jose, CA, USA）を加え、二重染色を行った。染色後、細胞をPBCで2回洗浄し、1%パラホルムアルデヒド（和光純薬、大阪）を含むPBS中で保存した。その後、フローサイトメーター（EPICS XL, Coulter, Hialeah, FL, USA）を用い、HM1.24抗原の発現を解析した。

【0066】

その結果、骨髓腫細胞株U266（図1）および患者骨髓腫細胞（図2）は無刺激の状態ではHM1.24抗原を発現しており、インターフェロナー α の刺激により、HM1.24抗原の発現量はさらに増加した。

インターフェロナー α は骨髓腫細胞のHM1.24抗原の発現をさらに増強させ、骨髓腫細胞へ結合する抗HM1.24抗体の数を増加させた。抗HM1.24抗体による治療の抗腫瘍効果は、結合する抗体数に比例することから、骨髓腫患者において、インターフェロナー α を投与した後に抗HM1.24抗体治療を行うことは、抗体による治療効果を増強し、より有効性を高める治療になると期

待される。

【0067】

実施例 2. レポーター遺伝子解析による HM1. 24 抗原の発現機能の解析

抗原の発現誘導が HM1. 24 プロモーター領域により調節されているかどうか調べるために、プロモーター領域でのレポーター遺伝子解析を行った。

HM1. 24 プロモーター領域の遺伝子（配列番号：3）は PCR クローニングにより得た。ヒト末梢血単核細胞より DNazol reagent (GIBCO) を用い、ゲノム DNA を調製した。得られたゲノム DNA を鋳型として、プライマー HM2k (aaaggtaccagctgtctttctgtctgtcc) (配列番号：4)、及び BST2B (atagtcatacgaagtagatgccatccag) (配列番号：5) を用い、TaKaRa Taq (宝酒造、大津) を用い Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer, CA, USA) にて PCR (94℃ 1min、55℃ 1min、72℃ 1min、30 cycles) を行った。

【0068】

得られた約 2 kb の断片を制限酵素 KpnI 及び BglII (宝酒造) にて処理し、レポータージーンプラスミド pGL3-basic (Promega, WI, USA) の KpnI-BglII サイトに DNA ligation kit ver. II (宝酒造) を用いてクローニングし、コンピテント E. coli JM109 (ニッポンジーン) を形質転換した。形質転換した大腸菌を 100 µg/ml のアンピシリンを含む LB 培地にて 37℃ 培養し、QIAGEN plasmid maxi kit (QIAGEN, Hilden, Germany) にてプラスミドを調製した。

【0069】

得られたプラスミド HM-2k/GL3 を制限酵素 KpnI 及び XhoI にて処理し、kilo-sequence 用 deletion kit (宝酒造) にて deletion clone を作製し、転写開始点上流-493 bp までを含むプラスミド HM-493/GL3 を得た。また HM-2k/GL3 を制限酵素 KpnI 及び AflII にて処理し、上記方法にて deletion clone を作製し、転写開始点上流-151 bp 又は -77 bp までを含む、それぞれ HM-151/GL3 及び HM-77/GL3 を得た。

【0070】

細胞へのプラスミド導入は Polyethylenimine-Transferrin infection Kit (Tf P

EL-Kit) (Bender MedSystems, Vienna, Austria)、ルシフェラーゼアッセイは Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いた。細胞株を $50 \mu\text{M}$ Defferrioxamine、 10% FBS を含む RPMI-1640 にて一晚培養した。導入するプラスミドを Tf-PEI との複合体にするため、終濃度 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ のレポータージーンプラスミド、 $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の pRL-SV40、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ Tf-PEI 試薬の混合液を作製し、室温で 20 分間インキュベートした。 5×10^5 細胞/ ml の細胞を Tf-PEI・プラスミド混合液の 3 倍容に加え、4 時間 37°C にてインキュベートし、培地にて洗浄後、 2×10^5 細胞/ ml の濃度で 1 well あたり $100 \mu\text{l}$ を 96 ウェル平底プレートで培養した。

【0071】

IFN- α を終濃度 0, 10, 100, 又は $1000 \text{ U}/\text{ml}$ となるよう添加し、 37°C 2 日間培養した。細胞を PBS (-) にて洗浄後、 $20 \mu\text{l}$ の Passive Lysis Buffer にて溶解し、 $6 \mu\text{l}$ を C36 White Polysorp Fluoronunc plate (Nunc) にアプライした。Luminoskan (Labsystems) にて基質液 $30 \mu\text{l}$ 、測定時間 10 秒にて Firefly 及び Renilla それぞれの発光強度を測定した。測定値は、Firefly/Renilla にて補正後、コントロール (medium) を 1 として相対活性を求めた。

【0072】

その結果、上流 2 kbp 及び 493 bp とともに IFN- α 濃度依存的にレポーターのルシフェラーゼ活性が上昇しており、プロモーター領域の転写活性上昇が抗原の発現誘導を引き起こすことを確認した (図 3)。

さらに、転写開始点上流 151 bp 又は 77 bp のレポータープラスミドを用いた結果では、上流 151 bp のレポータープラスミドでは IFN- α 刺激によりルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。一方上流 77 bp のレポータープラスミドでは IFN- α 刺激による活性の変化は認められなかった (図 4)。77~151 bp の領域には GAS element, ISRE に相同性の高い配列が存在し、IFN- α 刺激にตอบสนองして活性化する転写調節因子であることから、IRF ファミリーの転写調節因子が活性に関与していることが示された。

実施例 3. インターフェロン γ による骨髓腫細胞における HM1. 24 抗原発

現量の増強

実施例 1 に記載の方法により、1000 V/ml の天然型インターフェロン γ (R & D System 社) を用いて解析した。その結果、骨髓腫細胞株 U266 (図 5) および患者骨髓腫細胞 (図 6) において、インターフェロン α と同様に、HM1.24 抗原の発現量の増大が観察された。

【0 0 7 3】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

< 1 1 0 > CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

< 1 2 0 > Agent for enhancing expression of HM1.24 comprising as an active component interferon α

< 1 3 0 > 993953

< 1 6 0 > 5

< 2 1 0 > 1

< 2 1 1 > 1073

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Homosapiens

< 2 2 3 > Nucleotide sequence coding for HM1.24 protein antigen

< 4 0 0 > 1

gaattcggca cgagggatct gg atg gca tct act tcg tat gac tat tgc 49

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys

1 5

aga gtg ccc atg gaa gac ggg gat aag cgc tgt aag ctt ctg ctg ggg 97

Arg Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly

10 15 20 25

ata gga att ctg gtg ctc ctg atc atc gtg att ctg ggg gtg ccc ttg 145

Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu

30 35 40

att atc ttc acc atc aag gcc aac agc gag gcc tgc cgg gac ggc ctt 193

Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu

45 50 55

cgg gca gtg atg gag tgt cgc aat gtc acc cat ctc ctg caa caa gag 241

Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu

60 65 70

ctg acc gag gcc cag aag ggc ttt cag gat gtg gag gcc cag gcc gcc	289
Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala	
75 80 85	
acc tgc aac cac act gtg atg gcc cta atg gct tcc ctg gat gca gag	337
Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu	
90 95 100 105	
aag gcc caa gga caa aag aaa gtg gag gag ctt gag gga gag atc act	385
Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr	
110 115 120	
aca tta aac cat aag ctt cag gac gcg tct gca gag gtg gag cga ctg	433
Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu	
125 130 135	
aga aga gaa aac cag gtc tta agc gtg aga atc gcg gac aag aag tac	481
Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr	
140 145 150	
tac ccc agc tcc cag gac tcc agc tcc gct gcg gcg ccc cag ctg ctg	529
Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu	
155 160 165	
att gtg ctg ctg ggc ctc agc gct ctg ctg cag tga gatcccagga	575
Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln ***	
170 175 180	
agctggcaca tcttgaagg tccgtcctgc tcggcttttc gcttgaacat tcccttgatc	635
tcatcagttc tgagcgggtc atggggcaac acggttagcg gggagagcac ggggtagccg	695
gagaagggcc tctggagcag gtctggaggg gccatggggc agtcctgggt ctggggacac	755
agtcgggttg acccagggt gtctccctcc agagcctccc tccggacaat gagtcccccc	815
tcttgtctcc caccctgaga ttgggcatgg ggtgcggtgt ggggggcatg tgctgcctgt	875
tgttatgggt tttttttgcg ggggggggtt cttttttctg gggcttttga gctccaaaaa	935
aataaacact tcctttgagg gagagcacac cttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	995
aaaattcggg cgcccgcc	1013

【0 0 7 4】

< 2 1 0 > 2

< 2 1 1 > 180

< 2 1 2 > PRT

< 2 1 3 > Homosapiens

< 2 2 3 > Amino acid sequence of HM1.24 protein antigen

< 4 0 0 > 2

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg Val Pro Met Glu Asp Gly

1 5 10 15

Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu

20 25 30

Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala

35 40 45

Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg

50 55 60

Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly

65 70 75 80

Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met

85 90 95

Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys

100 105 110

Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln

115 120 125

Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu

130 135 140

Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser

145 150 155 160

Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser

165

170

175

Ala Leu Leu Gln

180

【 0 0 7 5 】

< 2 1 0 > 3

< 2 1 1 > 2016

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Homosapiens

< 2 2 3 > Nucleotide sequence of promoter region of gene coding for HM

1.24 protein antigen

< 4 0 0 > 3

actaaaagtc tctgatatgc agaaataatg gcataagctg tctttctgtc tgtccctctt 60

ctctctctct gcctcggctg ccaggcaggg aagggccccc tgtccagtgg acacgtgacc 120

cacatgacct tacctatcat tggagatgac tcacactctt taccctgccc cttttgcttt 180

gtatccaata aataacagca cagccagaca ttcggggcca ctaccagtct ccgcgcattg 240

ctggtagtgg tccccgggc ccagctgtct tttcttttat ctcttcgtct tgtgtcttta 300

tttctacact ctctcgtcgc cgcacacagg gagagaccca ctgaccctgt ggggctggtc 360

cctacagtaa ttttaaaggg aagagcaaca aactttcggg ttgcagggtt gggactgttt 420

acagctgcaa aatttagaga ggacatcaat ctattattat ccacatttta cagctgggga 480

aatcaatgct aagagaggaa attcatttgc ccagaggtgc accaccctgg cctccaatgt 540

gcaattcatg caattgtgat ttccgacctg gtcccaaact aaccctaaag ttagcaggcc 600

agaacagtgc tgctcaaata agtcagctta gtcaaataag tcaggcaaag gtcgtgtctt 660

tgcacctgga gtcctggcca ggctggtagg tccctcctcc tgggacaagt tcaccctcag 720

aattttcagc aagatcatct cccacagctt gttatttggg tcttggttct aagtgatttt 780

tttgtttatt ggtttaagag atgggatccc actctatcac ccaggcttga gtgccgtggc 840

acaatcatag ctgctgcag cctcaaactc ctgggctcga gtgatcctcc tgcctcagcc 900

tcccagcctc agcctgggac cacaggcatg taccacatg cctggctcta agtggcttta 960

atggggtcct tctgagggat gttggagtca gggcctgggg ggagttcccc aggccttctg 1020

ggaggcctgg gctctggact tgacctgcc tactgtctgg cctgctgaa aagaaaaaaa 1080
 aacatggaaa tggcagacct aacagaatct gggctgtggt caggatgtgg ctgaagaagc 1140
 cacaagaaaa acatgcagtc ccccttcagc ggtcatgccc agcagttggg tgccgataat 1200
 gggcctgatt tcctgtagga agccctggct ctcttgcca catggacagt gtctgaggct 1260
 ggccctgtta tcccccttg cagatgaaga aacaggctca gagagtttac ctggtatcct 1320
 ggagtcccag gagcactttt tctggaagta ggagcttggt tcctgcagggt gccaagacag 1380
 agaccgacat tgtttgttgg ctgggtcggt ctcccagttt tcagctggct ccagtctcac 1440
 ctgttgctca cacacctcc atgtctccca tagtcccctc ggtggggaca gaggcactgg 1500
 atgaagccct gctcgtcacc acagagacac ctgaacacaa aaaccagtcc ctggggtcag 1560
 acccaggccc cgtccccaga cccaggccct gccctcactc caccacgcaa ctgtgcaacc 1620
 tcagtttccc caggtggaga ccggaccaac aatgatggcc tctgcctctt caggtcatag 1680
 tacagatgaa tacaggctgg cagggcctag gcactcagta acacacggca gaggcacagg 1740
 gacttaagat ggagtgtccc aggcagccac agttggctgg caccagttg ggaagggcc 1800
 aagggtttt aaagcagggt gaaaaaaaaa gccacctcc tttctgggaa actgaaactg 1860
 aaaacctaat taatcctctg cctgtaggtg cctcatgcaa gagctgctgg tcagagcact 1920
 tcctggaact tgctattggt caggacgttt cctatgctaa taaaggggtg gcccgtagaa 1980
 gattccagca cctccccta actccaggcc agactccttt cagctaaagg ggagatctgg 2040
 atg gca tct act tcg tat gac 2061

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp

5

[0 0 7 6]

< 2 1 0 > 4

< 2 1 1 > 29

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > Primer HM2K

< 4 0 0 > 4

aaaggtacca gctgtctttc tgtctgtcc

29

[0 0 7 7]

< 2 1 0 > 5

< 2 1 1 > 78

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > Primer BST2B

< 4 0 0 > 5

atagtcatac gaagtagatg ccatccag

28

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、インターフェロン α の非存在下（上）は存在下（下）で培養した骨髓腫細胞株 U266 を、標識としてヒト IgG（対照）又は抗 HM1.24 抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。

【図 2】

図 2 は、インターフェロン α の非存在下（上）又は存在下（下）で培養した患者骨髓腫細胞を、標識としてヒト IgG（対照）又は抗 HM1.24 抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。

【図 3】

図 3 は、HM1.24 抗原をコードする遺伝子のプロモーター領域を挿入したレポータープラスミドにより形質転換した U266 細胞をインターフェロン α の非存在下又は種々の濃度での存在下で培養した後ルシフェラーゼ活性を測定した結果を示すグラフである。

【図 4】

図 4 は、HM1.24 抗原をコードする遺伝子のプロモーター領域の内、転写開始点から 151 bp 上流まで、又は 77 bp 上流までを挿入したレポータープラスミドにより形質転換された U266 細胞又は HEL 細胞を、インターフェロン α （1000 U/ml）の存在下で培養した後にルシフェラーゼ活性を測定した結果を示すグラフである。

【図 5】

図 5 は、インターフェロン γ の非存在下（上）は存在下（下）で培養した骨髓腫細胞株 U266 を、標識としてヒト IgG（対照）又は抗 HM1.24 抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。

【図 6】

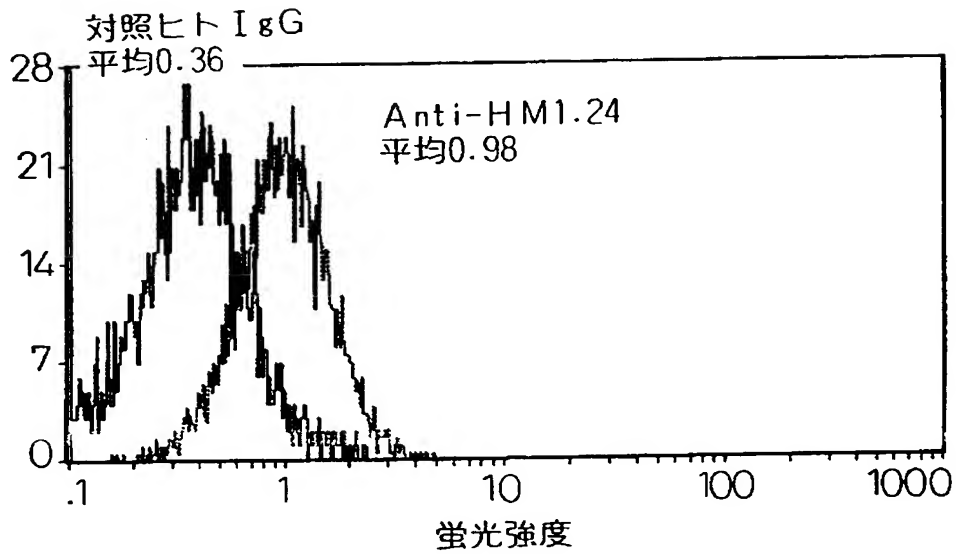
図 6 は、インターフェロン γ の非存在下（上）又は存在下（下）で培養した患者骨髓腫細胞を、標識としてヒト IgG（対照）又は抗 HM1.24 抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。

【書類名】 図面

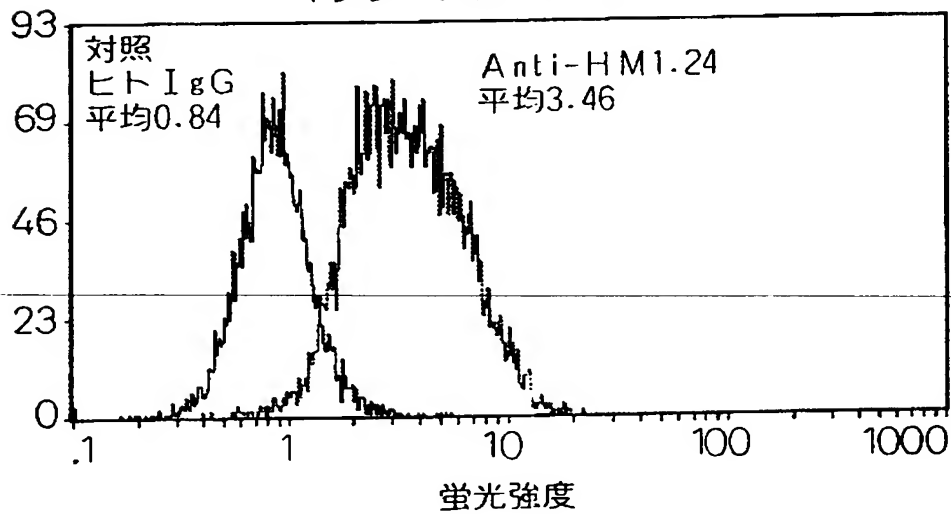
【図 1】

図 1

インターフェロ α (-)

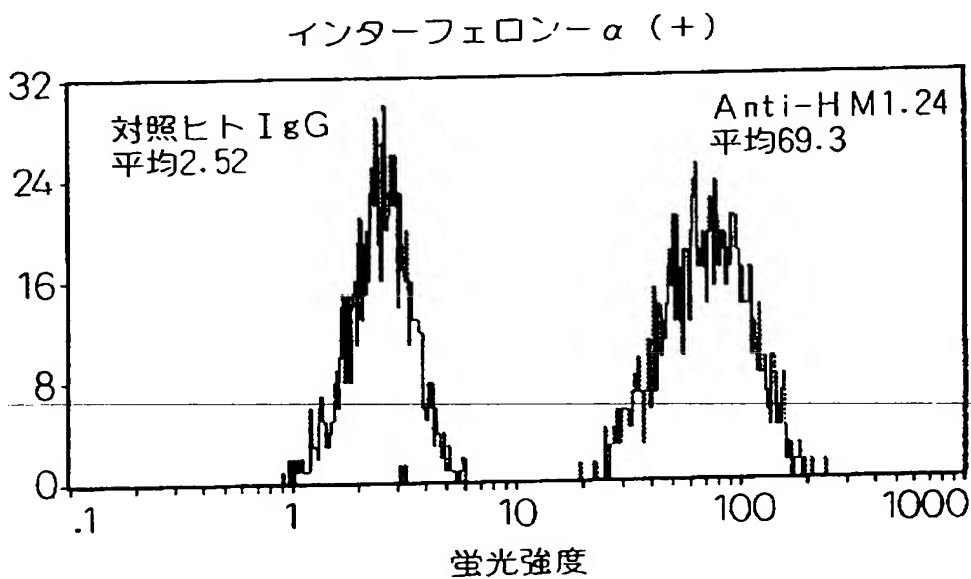
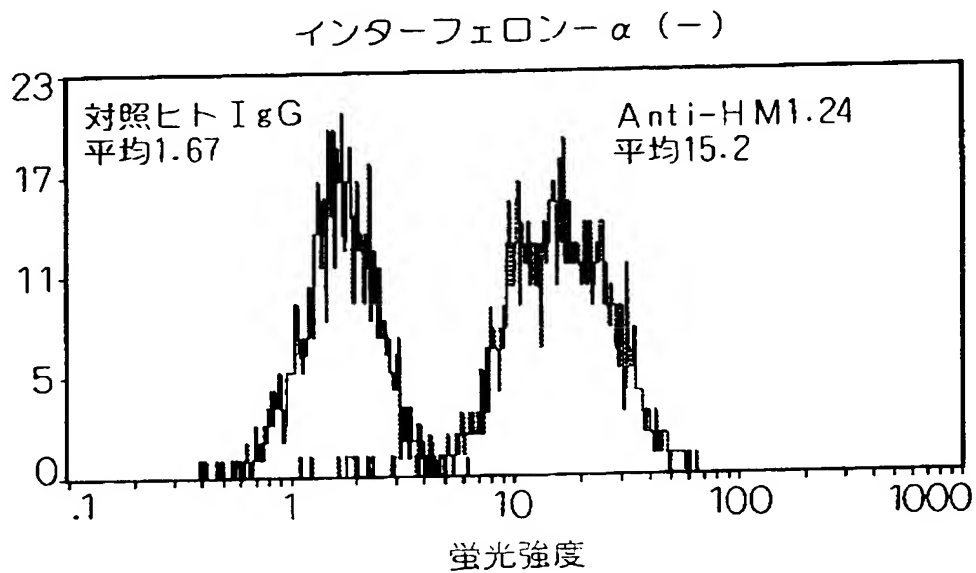


インターフェロ α (+)



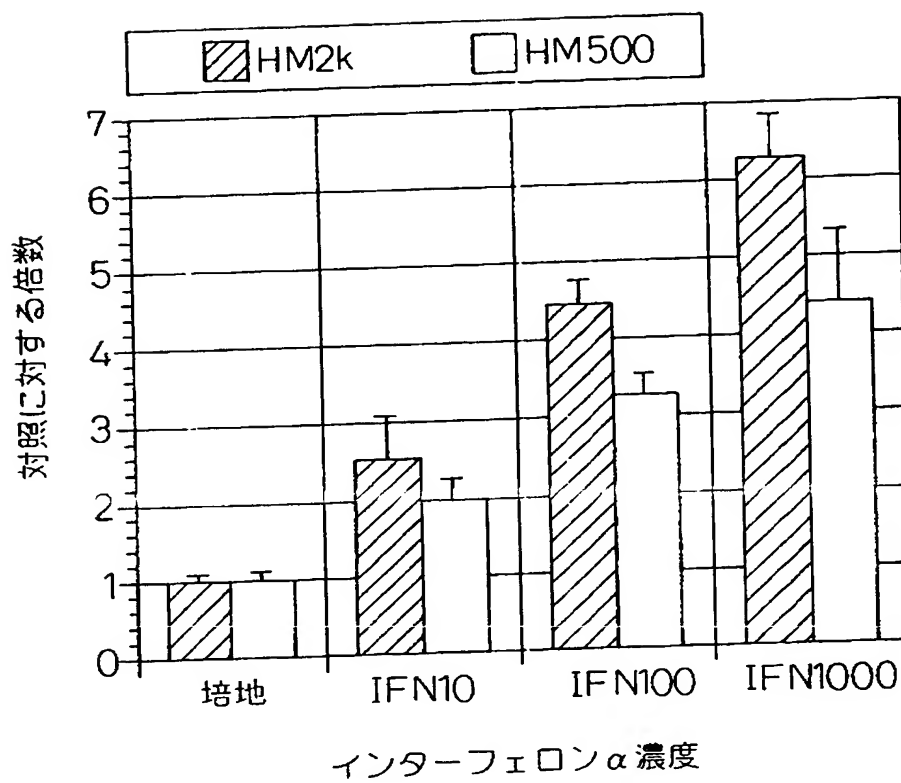
【図2】

図 2



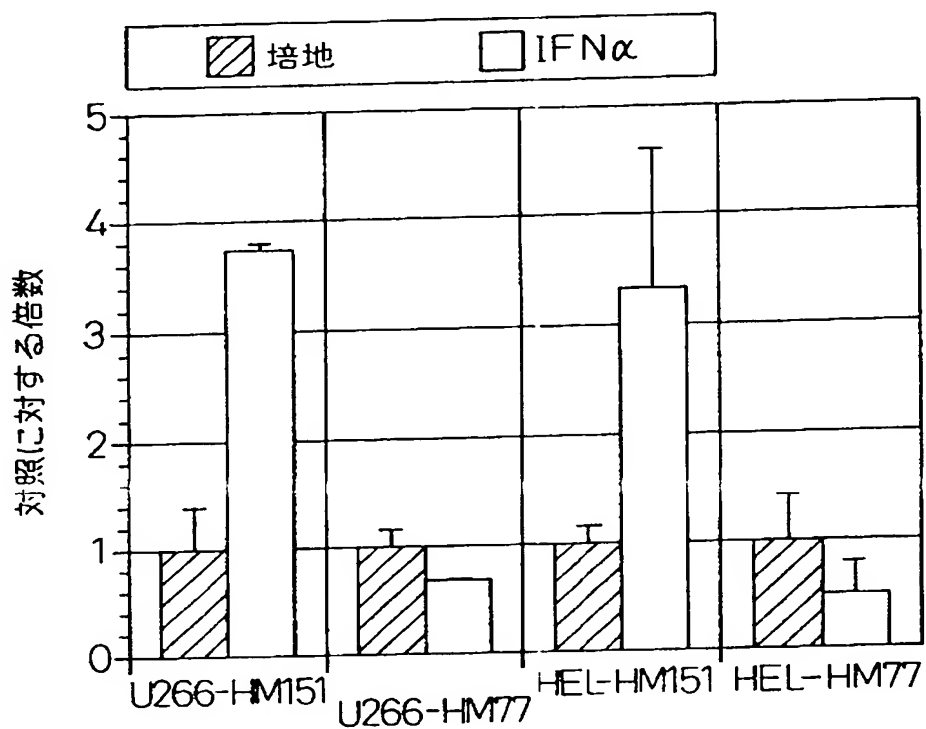
【図3】

図 3



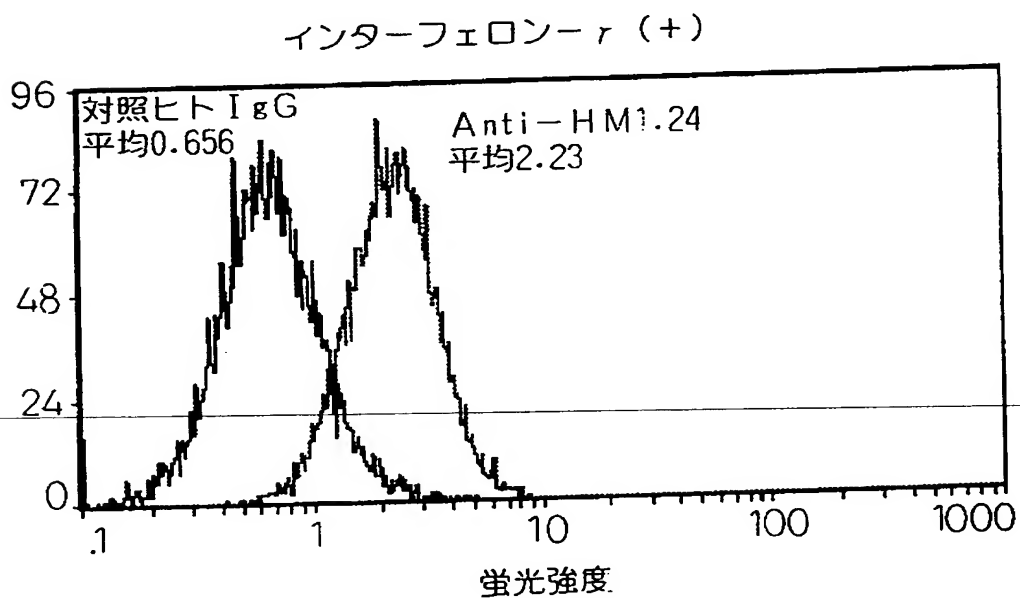
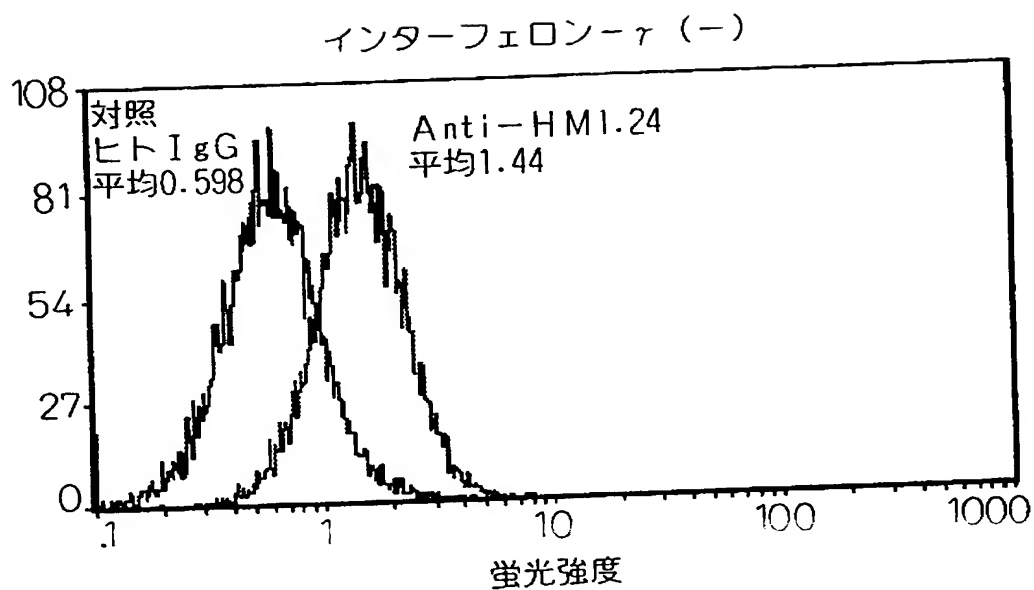
【図 4】

図 4



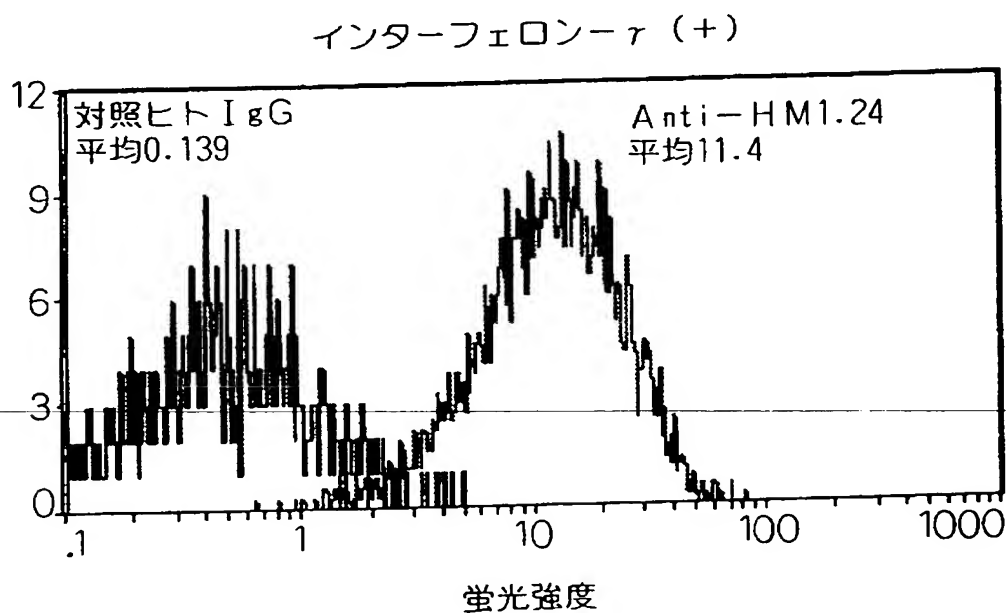
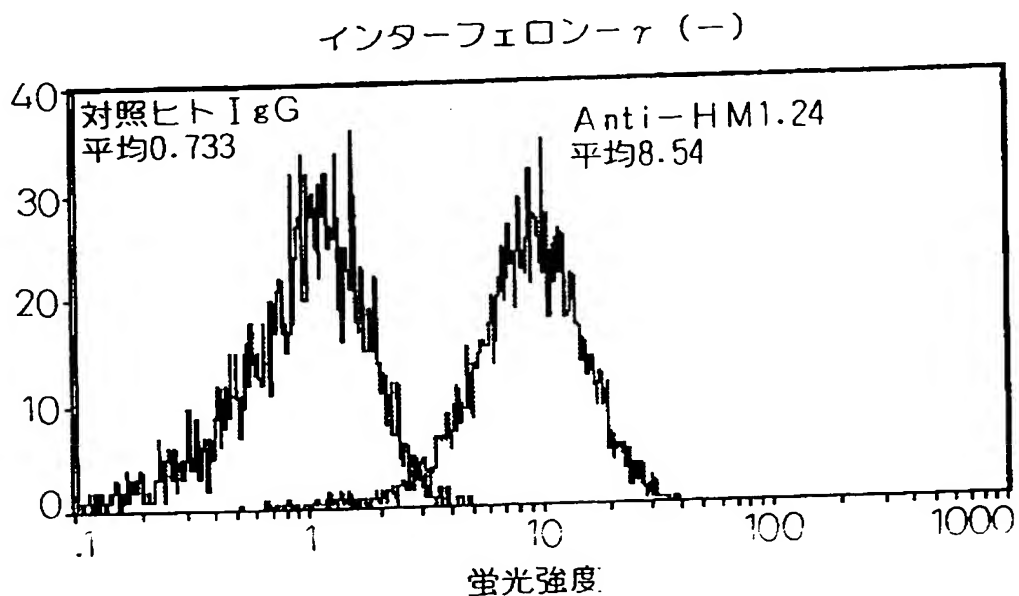
【図 5】

図 5



【図 6】

図 6



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抗癌性を有する抗HM1.24抗体の標的としてのHM1.24癌抗原の発現を増強する新規な手段の提供。

【解決手段】 インターフェロン α またはインターフェロン γ を有効成分とする、骨髄腫細胞におけるHM1.24抗原の発現増強剤。インターフェロン α および γ は、HM1.24抗原をコードする遺伝子のプロモーターの活性化を介して、HM1.24抗原の発現を増強すると予想される。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000003311]

1. 変更年月日	1990年 9月 5日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都北区浮間5丁目5番1号
氏 名	中外製薬株式会社

